

Une algue pour l'étude de la génétique des organites : *Chlamydomonas reinhardtii*

Francis-André Wollman, Jacqueline Girard-Bascou

Société Française de Génétique

Président
A. Nicolas

Président d'honneur
F. Jacob

Vice-présidents
R. Berger
H. Pinon
C. Stoll

Secrétaire général
M. Solignac

Trésorier
P.-M. Sinet

Prière d'adresser toute correspondance au Secrétaire général de la SFG, Michel Solignac, laboratoire de biologie et génétique évolutives, bâtiment 13, Cnrs, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Comité de rédaction
A. Bernheim
M. Bolotin-Fukuhara
M. Fellous
J. Génarmont
B. Michel
R. Motta
A. Nicolas
S. Sommer
P. Thuriaux
D. de Vienne

Secrétaire
M.-L. Prunier

Le choix d'un organisme modèle

Chacun peut imaginer l'intérêt des recherches menées sur de nombreuses plantes (tomate, tabac, maïs, orge, pétunia etc.) ayant un intérêt agronomique ou horticole dans l'optique d'une amélioration de certains de leurs caractères. Ces organismes suscitent également l'intérêt dans le domaine de la bioénergétique et de la biologie cellulaire en raison de leur organite spécifique, le chloroplaste, siège de la photosynthèse. Deux organismes modèles peuplent maintenant les laboratoires versés dans l'étude des processus fondamentaux du monde végétal. L'un d'eux est une petite crucifère des champs et jardins, *Arabidopsis thaliana*. Elle a été choisie comme plante modèle pour l'étude du génome nucléaire des plantes supérieures. Elle est, en particulier, très utilisée dans les études de différenciation des cellules végétales. Les recherches centrées sur l'expression génétique et le fonctionnement du chloroplaste sont plus commodément abordées chez un autre eucaryote vert, l'algue unicellulaire d'eau douce *Chlamydomonas reinhardtii*, de l'ordre des Volvocales.

Toute cellule végétale possède trois compartiments qui contiennent, chacun, de l'information génétique : le noyau, le plaste et la mitochondrie. Le rôle de chacun de ces génomes et leurs interactions pour une expression concertée ne peuvent être étudiés que si une approche génétique

simultanée des trois génomes est possible. L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* réunit toutes les conditions pour une telle étude, ce qui n'est le cas d'aucune autre algue ou plante. Bien que cette petite algue ait des caractéristiques originales (comme la capacité de nager à l'aide de deux flagelles), elle possède un appareil photosynthétique semblable à celui des plantes supérieures. Nous disposons ainsi d'un organisme modèle – *Chlamydomonas reinhardtii* – exprimant un système modèle – la photosynthèse – pour étudier une question fondamentale : l'expression génétique dans le chloroplaste.

Un peu d'histoire

La possibilité d'isoler des mutants à hérédité non mendélienne dans les années 50 a ouvert la voie à la découverte du génome des organites. L'histoire de la génétique mitochondriale chez la levure débute avec la découverte par Boris Ephrussi et ses collaborateurs de mutants « petite » à hérédité non mendélienne. Ces mutations petites *rho*⁻ se sont révélées être des délétions de l'ADN mitochondrial [1, 2]. A la même époque, des mutants à hérédité non mendélienne ont été identifiés chez *C. reinhardtii* par Ruth Sager (pour une revue, voir [3]). Ces mutations, conférant une résistance à des antibiotiques, avaient une hérédité principalement uniparentale liée à l'un des types sexuels. La preuve directe de la localisation de ces mutations à hérédité uniparentale sur l'ADN

chloroplastique (ADNcp) n'a été apportée que tardivement, à la fin des années 1970, alors même que des cartes de restriction du chromosome circulaire du chloroplaste étaient déjà constituées. De nombreuses mutations à hérédité maternelle ont été caractérisées, depuis, sur le génome chloroplastique.

L'intérêt pour *C. reinhardtii*, comme organisme de choix dans l'étude des organites, a augmenté dans les années 1960 quand Ralph Levine et ses collaborateurs ont commencé à isoler de nombreux mutants nucléaires de photosynthèse sur la base d'une croissance exigeant de l'acétate dans le milieu de culture. *C. reinhardtii* présente en effet la particularité exceptionnelle pour un eucaryote photosynthétique, de pouvoir être cultivée à l'obscurité en présence d'une source de carbone réduit. Cette particularité a rendu possible une approche génétique de la photosynthèse chez cette algue. L'étude de mutations altérant l'appareil photosynthétique fut affinée dans les années 1970 par le recours à des cribles d'émission de fluorescence, une propriété des pigments chlorophylliens qui est modulée par l'activité photosynthétique. Cette méthode permet d'attribuer rapidement une mutation à une altération de l'un ou l'autre des complexes protéiques majeurs de l'appareil photosynthétique [4]. L'obtention de mutations dans l'ADN mitochondrial date de ces dernières années [5]. Le développement d'une approche génétique de la respiration complète ainsi les possibilités d'étude des organites chez cet organisme. Notons enfin que *C. reinhardtii* est également utilisée comme organisme modèle dans le domaine de la motilité cellulaire, en raison de la variété de mutants de flagelles qui ont été isolés [3].

Une physiologie remarquable pour le généticien

C. reinhardtii peut-être cultivée au laboratoire en milieu solide comme en milieu liquide, avec un temps de génération de quelques heures. Elle peut croître aussi bien sous forte lu-

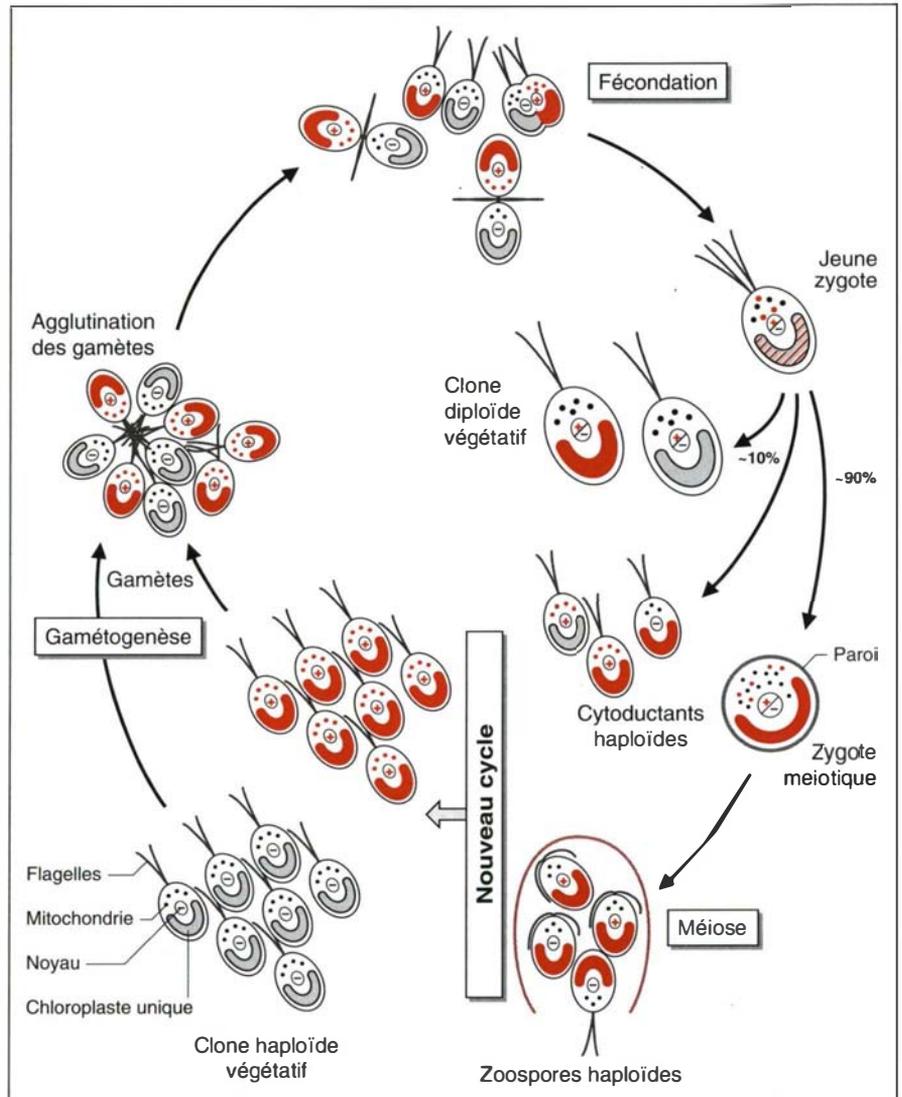


Figure 1. Cycle sexuel de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. La mise en présence de cellules haploïdes de signe sexuel + et -, différenciées en gamètes après une carence en ammonium de quelques heures, produit une agglutination de leurs flagelles qui permet la fécondation. Une minorité des jeunes zygotes (< 10 %) donnera naissance à des cellules diploïdes végétatives ou à des cytoductants. La majorité des jeunes zygotes (90 %) développera une paroi qui accompagne la formation d'un zygote méiotique. Après une phase de maturation, ces zygotes libéreront des zoospores haploïdes. L'élimination du génome chloroplastique d'origine + est rapide après la fécondation, alors que celle du génome mitochondrial d'origine - semble plus tardive. La plupart des zoospores haploïdes auront hérité du génome mitochondrial du parent - et du génome chloroplastique du parent +. Les situations dessinées pour les diploïdes végétatifs et les cytoductants ne sont pas exhaustives ; elles indiquent la possibilité d'hérédité biparentale. Le diamètre d'une cellule haploïde est d'environ 10 μm .

mière sur un milieu ne comportant pas de source de carbone réduit (phototrophie), qu'en présence d'acétate à l'obscurité (hétérotrophie) ou à la lumière (mixotrophie). En jouant sur ces différents modes de croissance, il est possible de sélectionner des mutants de photosynthèse ou de respiration. Les mutants de photosynthèse, qui ne poussent plus en condition phototrophe, poussent en condition hétérotrophe (exigence en acétate). Les mutants de respiration, qui ne poussent plus en condition hétérotrophe, sont phototrophes obligatoires. Différents types d'inhibiteurs (antibiotiques bloquant la traduction chloroplastique, inhibiteurs de la photosynthèse ou de la respiration) peuvent être ajoutés à ces milieux, ce qui permet de sélectionner des mutants de résistance. Ainsi une large gamme de mutants, altérés dans le métabolisme des organites, peut être sélectionnée par les cribles de la génétique classique. Le recours à différents types d'agents mutagènes permet d'induire des mutations préférentiellement nucléaires (rayons ultraviolets, par exemple), chloroplastiques (5-fluorodeoxyuridine) ou mitochondriales (manganèse).

Le cycle de reproduction de *C. reinhardtii* est haplobiontique (figure 1) et permet une variété d'études génétiques. Les croisements se font entre deux souches de types sexuels opposés (+ et -). La phase de différenciation gamétique est induite en laboratoire par une carence en ammonium qui dé-réprime la compétence sexuelle. La fécondation donne lieu dans la majorité des cas à la formation d'un zygote diploïde qui perd ses flagelles et s'entoure d'une paroi collante. On peut alors laisser ces zygotes se coller entre eux jusqu'à former une «peau de zygotes» qui conserve pendant 2 à 4 jours ses propriétés photosynthétique, rendant possible des tests de complémentarité fonctionnelle entre mutants nucléaires. Ces zygotes peuvent également être déposés sur milieu solide et placés à l'obscurité pour une phase de maturation qui les rend compétents pour la méiose. L'induction de

la méiose se fait par un retour à la lumière et fournit des tétrades de cellules haploïdes. L'étude de la ségrégation des caractères mutants après la méiose permet de distinguer aisément les mutations nucléaires, chloroplastiques et mitochondriales. Les mutations nucléaires présentent une hérédité biparentale mendélienne tandis que les mutations chloroplastiques sont en général transmises par le type sexuel + (appelé de manière traditionnelle maternelle, bien que le tube de fertilisation soit émis par le gamète +). Quant aux mutations mitochondriales, elles sont également transmises de manière uniparentale mais par les allèles apportés par la souche parentale de type sexuel- [5]. Au cours du cycle de reproduction, deux situations plus rares (2 à 10% des fécondations) peuvent être exploitées à des fins génétiques. Certains zygotes diploïdes ne passent pas la méiose et restent à l'état végétatif. Ils permettent de caractériser la dominance/récessivité des mutations nucléaires. Ils sont également un matériel de choix pour effectuer des études de recombinaison entre mutations chloroplastiques car ils présentent une forte hérédité biparentale de l'ADNcp. L'autre événement rare et précieux pour le généticien est la cytoduction, qui désigne une mitose intervenant avant la fusion des noyaux. A l'aide de cribles de sélection appropriés, on peut mettre en évidence des cytoductants associant des marqueurs chloroplastiques ou mitochondriaux avec un génome nucléaire donné, indépendamment du type sexuel [6].

L'apport de la transformation génétique

De nombreuses innovations en génétique et en biologie moléculaire ont été réalisées ces dernières années. Des techniques de transformation ont été mises au point pour les trois génomes. La transformation des organites est réalisée par bombardement des cellules avec des particules de tungstène de 1,2 µm de diamètre enrobées d'ADN. L'unique chloroplaste, qui occupe environ 40 % du

volume cellulaire et est adjacent à la membrane plasmique sur une grande partie de la cellule, est une cible privilégiée. L'optimisation rapide de la technique a permis de passer de 10 à 20 transformants par µg d'ADN transformant [7] à environ 500 transformants par µg d'ADN (données de Richard Kurias dans notre laboratoire), mais cela peut varier avec le plasmide employé et la région du génome concernée. Du fait du grand nombre de copies de cette molécule, il faut attendre plusieurs générations pour que toutes les copies soient identiques (homoplasme). La sélection peut se faire facilement lorsque la transformation restaure une fonction photosynthétique altérée. Dans le cas contraire on a recours à un marqueur de résistance à un antibiotique qui permet de sélectionner les transformants puis de cribler des mutants déficients en une activité photosynthétique [8]. La transformation nucléaire est réalisée par une autre technique, en passant au vortex des cellules sans parois en présence du plasmide choisi et de billes de verre. Environ 1 000 transformants sont obtenus par µg d'ADN.

La transformation chloroplastique correspond à une intégration de fragments d'ADN par recombinaison homologue. On peut donc réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur des gènes d'organite facilitant les études sur la régulation de l'expression génétique et la biogenèse des protéines dans le chloroplaste.

La transformation mitochondriale par bombardement est moins aisée à réaliser car ces organites sont de petite taille et, de ce fait, elle a été encore peu étudiée. La restauration d'une activité respiratoire a cependant été obtenue par transformation d'un mutant portant une délétion de 1,5 kpb à l'une des extrémités de l'ADN mitochondrial [9].

La transformation du génome nucléaire permet l'intégration de quelques exemplaires d'un fragment d'ADN en des sites non homologues [10]. On peut donc compléter, à l'aide de banques génomiques, les mutations nucléaires obtenues par mutagenèse classique [11, 12]. On

peut également utiliser la transformation nucléaire comme méthode de mutagenèse par insertion. On utilise alors un marqueur de sélection, qui permet, par exemple, la croissance sur nitrate ou qui supprime une exigence en arginine, pour transformer une souche mutante dépourvue de ces propriétés. Le gène inactivé par l'insertion devient repérable et clonable [13]. L'obtention de transformants nucléaires par recombinaison homologue reste difficile en dépit de quelques expériences préliminaires encourageantes [14].

Les trois génomes

Le noyau, le chloroplaste et la mitochondrie contiennent chacun un génome. Ces génomes se distinguent par leur quantité, leur forme et leur taille.

Le contenu en ADN total d'une cellule haploïde a été estimé à $1,8 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g}/\text{cellule}$; 14 % de cet ADN est de l'ADN chloroplastique et 1 à 2 % de l'ADN mitochondrial. La taille du génome nucléaire est estimée à 10^8 paires de bases, semblable à celle du génome nucléaire d'*Arabidopsis*. Ce génome est réparti sur dix-neuf groupes de liaison. L'un de ces groupes, qui contient des gènes jouant un rôle dans l'assemblage et le fonctionnement des flagelles, présente une carte génétique circulaire et pourrait représenter un chromosome particulier ; notamment, il ne recombine pas au même moment que les autres chromosomes. L'observation au microscope des chromosomes en mitose et en méiose est difficile et le nombre de chromosomes reste non déterminé. Le génome chloroplastique est une molécule d'ADN circulaire de 62 μm de contour contenant 196 kpb (figure 2). Il comporte, comme la plupart des génomes chloroplastiques, deux séquences inversées répétées (IR) qui séparent le génome en deux régions de séquence unique. Deux formes isomères sont observées qui s'expliquent par une recombinaison intramoléculaire au sein des inversions répétées (mécanisme du flip-

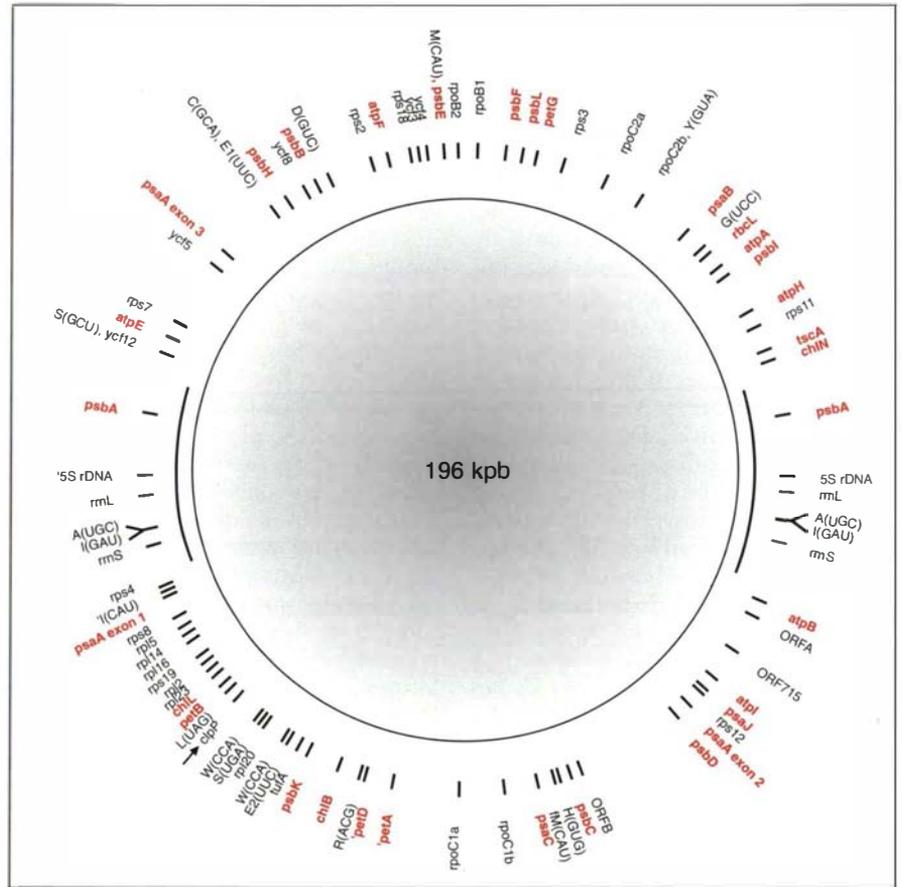


Figure 2. Le génome chloroplastique de *C. reinhardtii*. Les deux arcs de cercle situés à l'extérieur du chromosome circulaire délimitent la longueur des inversions répétées, tandis que les tirets indiquent la position des différents gènes chloroplastiques. Les gènes associés à la photosynthèse sont indiqués en rouge. Les phases de lecture ouverte qui sont conservées chez d'autres espèces photosynthétiques sont désignées par convention ycf; celles qui ne sont pas conservées sont dénommées ORF. Le gène *clpP* est indiqué par une flèche (d'après [40]).

flop). Il se trouve en moyenne 80 copies de ce chromosome circulaire par cellule haploïde, organisées en un petit nombre d'unités (1 à 7) ou nucléoïdes. Le génome mitochondrial est un génome linéaire de très petite taille, 4,7 μm de longueur, contenant 15,8 kpb, également en copies multiples [15]. Ce génome mitochondrial par sa taille est plus proche de celui des mammifères (16 kpb) que de celui de la levure (75 kpb) ou des plantes supérieures (200 kpb ou plus).

Les cartes génétiques et physiques des trois génomes

Une carte moléculaire du génome nucléaire est en construction avec le concours spontané de divers laboratoires à travers le monde. Elle utilise l'existence d'un polymorphisme de fragments de restriction entre deux espèces interfertiles *C. reinhardtii* et *C. smithii*. Des liaisons génétiques sont recherchées entre ces marqueurs moléculaires et les marqueurs génétiques déjà connus. La fréquence

ce moyenne de recombinaison est de 1 % pour 100 kpb environ. Mais cette fréquence peut varier considérablement suivant les régions du génome nucléaire étudiées. Elle est vingt fois supérieure dans la région du gène *arg7* [16]; en revanche, aucune recombinaison n'est détectable sur 640 kpb au niveau du locus sexuel [17].

Des tentatives de corrélation entre les distances physiques et génétiques ont également été faites sur le génome chloroplastique. Elles reposent sur des études de recombinaison chloroplastique menées, soit sur la descendance haploïde de zygotes méiotiques biparentaux (en traitant les gamètes maternels aux UV pour augmenter la fréquence de ces zygotes biparentaux), soit sur la descendance diploïde de zygotes végétatifs où l'hérédité biparentale est toujours abondante. Les quelques corrélations, établies dans les séquences uniques [18], sont semblables à celles trouvées dans l'inversion répétée [19] : 1 kpb correspond environ à 1 % de recombinaison. Il existe cependant des « points chauds » de recombinaison [20]. Les fréquences de recombinaison maximale observées se situent autour de 25 %, ce qui reflète une indépendance génétique dans le cas des systèmes à copies multiples [18]. Plusieurs mutations ont été caractérisées dans les gènes mitochondriaux *COB* (codant pour l'apocytochrome b) et *COXI* (codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase) [5]. A partir d'études de recombinaison intra- et intergénique en phase diploïde, on peut estimer que le taux moyen de recombinaison pour 1 kpb est de l'ordre de 3 à 6 % chez *C. reinhardtii* (René Matagne *et al.*, communication personnelle).

Les taux de recombinaison permettent donc d'établir des cartes génétiques pour les trois génomes. Il est intéressant de remarquer que la recombinaison dans les organites est beaucoup plus élevée que dans le noyau, et qu'elle est du même ordre de grandeur que dans les bactéries. Cependant, l'élimination précoce de l'un des génomes parentaux des or-

ganites avant la méiose (qui conduit à l'hérédité uniparentale) interdit la recombinaison dans les zygotes méiotiques. Ce phénomène contribue en partie à la conservation de ces génomes.

Le patrimoine génétique des organites

On distingue deux classes de gènes dans le génome chloroplastique ou mitochondrial (*figure 2*). Dans la première classe se trouvent des gènes codant une partie de l'information requise pour l'expression génétique dans l'organite. Cette propriété traduirait l'origine endosymbiotique des chloroplastes comme des mitochondries; cette hypothèse est étayée par la similitude des sous-unités des appareils de transcription et de traduction des organites et des bactéries. L'appareil de transcription est représenté sur le génome chloroplastique par les gènes *rpo* codant les sous-unités d'une ARN polymérase de type bactérien. Quant à la traduction, elle mobilise de nombreux gènes chloroplastiques, dont les séquences sont proches de celles de leurs homologues bactériens, qui codent certaines sous-unités protéiques des ribosomes (gènes *rps* et *rpl*) ainsi que les ARN ribosomiques correspondants. Ces derniers sont également présents mais morcelés dans le génome mitochondrial. Le génome chloroplastique contient également un ensemble de gènes *tm*, suffisant pour coder tous les types d'ARNt, mais le génome mitochondrial n'en contient que trois [15].

La deuxième classe de gènes présente dans les organites code une partie des protéines spécifiquement impliquées dans le métabolisme bioénergétique associé à leurs membranes internes: protéines de l'appareil respiratoire pour les mitochondries ou protéines de l'appareil photosynthétique pour les chloroplastes. La famille des gènes impliqués dans la photosynthèse et situés dans le génome chloroplastique est remarquablement conservée depuis *C. reinhardtii* jusqu'aux plantes supérieures. A l'inverse, parmi les 13 gènes codant des

sous-unités de l'appareil respiratoire habituellement présents dans les génomes mitochondriaux, 6 sont absents chez *C. reinhardtii*. La localisation dans le noyau ou dans les organites des gènes associés à la photosynthèse ou à la respiration a été systématiquement comparée chez de nombreux eucaryotes [21]. Les gènes qui codent les protéines les plus hydrophobes – celles ayant plus de trois hélices transmembranaires – sont toujours situés dans les génomes des organites. Ces protéines sont donc traduites au voisinage des membranes dans lesquelles elles vont s'insérer. La distribution génétique entre noyau et organites semble donc refléter pour une large part les limites propres à l'appareil de transport et d'importation des protéines hydrophobes traduites dans le cytoplasme. Pourtant, certains des gènes spécifiquement absents dans les mitochondries de *C. reinhardtii*, codent des protéines très hydrophobes. Il sera particulièrement intéressant d'étudier le mode d'importation de ces protéines dans la mitochondrie si elles se révèlent effectivement codées par le génome nucléaire.

Il faut remarquer que les produits des gènes de l'organite ne suffisent à assurer ni son expression génétique ni son activité métabolique spécifique. Ces fonctions requièrent l'expression d'autres gènes de structure, nucléaires cette fois (*Tableau 1*). La dualité de l'origine génétique des sous-unités qui composent les complexes protéiques concernés conduit à se poser de nombreuses questions sur leur biogenèse. Les différentes sous-unités sont-elles produites de façon concertée? Quelles sont les règles de l'« adressage » différentiel qui permettent aux sous-unités traduites dans le cytoplasme d'être convenablement transférées au chloroplaste ou à la mitochondrie? Quel est le mode de transport de ces sous-unités? Quelles sont les voies de biosynthèse et d'acheminement des cofacteurs? Toutes ces questions sont au cœur des études menées chez *C. reinhardtii*, concernant le chloroplaste. Elles ne peuvent être convenablement traitées qu'à mesure que nous

Tableau I
COMPLEXES PROTÉIQUES DE LA MEMBRANE PHOTOSYNTHÉTIQUE

Photosystème II		Cytochrome b6f		Photosystème I		ATP synthétase				
gènes de structure	sous-unités	gènes de régulation	gènes de structure	sous-unités	gènes de régulation	gènes de structure	sous-unités	gènes de régulation		
<i>psbA</i>	(D1)	1	<i>petA</i>	(apocytf)	2	<i>psaAI</i>	} (P2a)	<i>atpA</i>	(α.CF1)	2
<i>psbB</i>	(P5)	1	<i>petB</i>	(apocytb6)	4	<i>psaAII</i>		<i>atpB</i>	(β.CF1)	1
<i>psbC</i>	(P6)	2	<i>petD</i>	(s.u.IV)	2	<i>psaAIII</i>		<i>atpE</i>	(ε.CF1)	
<i>psbD</i>	(D2)	3	<i>petG</i>	(4 kD)		<i>tscA</i>		<i>atpF</i>	(I.CF0)	
<i>psbE</i>	(apocyt559)		<i>petC</i>	(Rieske)		<i>psaB</i>	(P2b)	<i>atpH</i>	(III.CF0)	
<i>psbF</i>	(apocyt559)		<i>petV</i>	(16 kD)		<i>psaC</i>	(Fe-S)	<i>atpI</i>	(IV.CF0)	
<i>psbH</i>	(8,5 kD)		<i>petX</i>	(16 kD)		<i>psaJ ?</i>	(5 kD)	<i>atpC</i>	(γ CF1)	
<i>psbI</i>	(5 kD)					<i>psaJ</i>	(4 kD)	<i>atpD</i>	(δ.CF1)	
<i>psbK</i>	(3,9 kD)					<i>psaM ?</i>	(3,5 kD)	<i>atpG</i>	(II.CF0)	
<i>psbL</i>	(5 kD)					<i>psaD</i>	(18 kD)			
<i>psbM</i>	(4,7 kD)					<i>psaE</i>	(11 kD)			
<i>psbN</i>	(4,7 kD)					<i>psaF</i>	(18 kD)			
<i>psbS</i>	(3,4 kD)					<i>psaG</i>	(5 kD)			
<i>psbO</i>	(OEE1)					<i>psaH</i>	(13 kD)			
<i>psbP</i>	(OEE2)					<i>psaK</i>	(3 kD)			
<i>psbQ</i>	(OEE3)					<i>psaL ?</i>	(17 kD)			
<i>psbR ?</i>						<i>psaN ?</i>	(9,8 kD)			

Gènes chloroplastiques et nucléaires impliqués dans la biogenèse des quatre complexes protéiques majeurs de la membrane photosynthétique. Les gènes de structure chloroplastiques sont indiqués en rouge et les gènes nucléaires en noir. Le polypeptide codé par chaque gène est indiqué entre parenthèse selon sa nomenclature [3] ou sa masse moléculaire. Les gènes nucléaires identifiés à ce jour, qui gouvernent l'expression des gènes chloroplastiques, sont indiqués par leur nombre en face de leur gène cible. Les gènes suivis d'un ? n'ont pas encore été identifiés chez *C. reinhardtii*.

améliorons notre compréhension des règles de l'expression génétique et de la biogenèse des protéines du chloroplaste.

Les règles de l'expression génétique dans le chloroplaste

Une quasi-absence de regroupements génétiques mono-fonctionnels

La disposition des gènes le long du chromosome circulaire du chloroplaste indique une différence majeure vis-à-vis de l'organisation génétique des procaryotes auxquels on le rattache volontiers. Les gènes codant les sous-unités d'un même complexe

protéique multimérique sont très dispersés, qu'il s'agisse des gènes *rpo* codant les sous-unités de l'ARN polymérase ou encore des familles *psa*, *psb*, *pet* ou *atp*, de la photosynthèse (Tableau I et figure 2). Cette dispersion contraste singulièrement avec l'organisation bactérienne en opérons, qui permet l'expression coordonnée de protéines destinées à interagir sur le plan fonctionnel. Cette évolution de la disposition des gènes d'une même famille est illustrée figure 3 dans le cas des gènes *atp*, codant les sous-unités de l'ATP synthétase à protons. On observera que les ADNcp de plantes supérieures présentent pour les gènes *atpB* (β) et *atpE* (ε) une réminiscence d'une organisation en opé-

rons bactériens, ce qui n'est pas le cas chez *C. reinhardtii*.

On trouve cependant deux exemples d'unité de transcription polycistronique présents dans tous les génomes chloroplastiques qui restent similaires aux opérons bactériens. L'un concerne les gènes des ARN ribosomiques qui sont regroupés et cotranscrits suivant la même séquence, 16S-23S-5S, que chez les procaryotes. L'autre concerne les gènes de plusieurs protéines ribosomiques qui ont conservé une disposition semblable à celle des opérons S10 et *spc* de *E. coli* (figure 2). Cette particularité pourrait être liée à des modes de transcription distincts de ceux qui

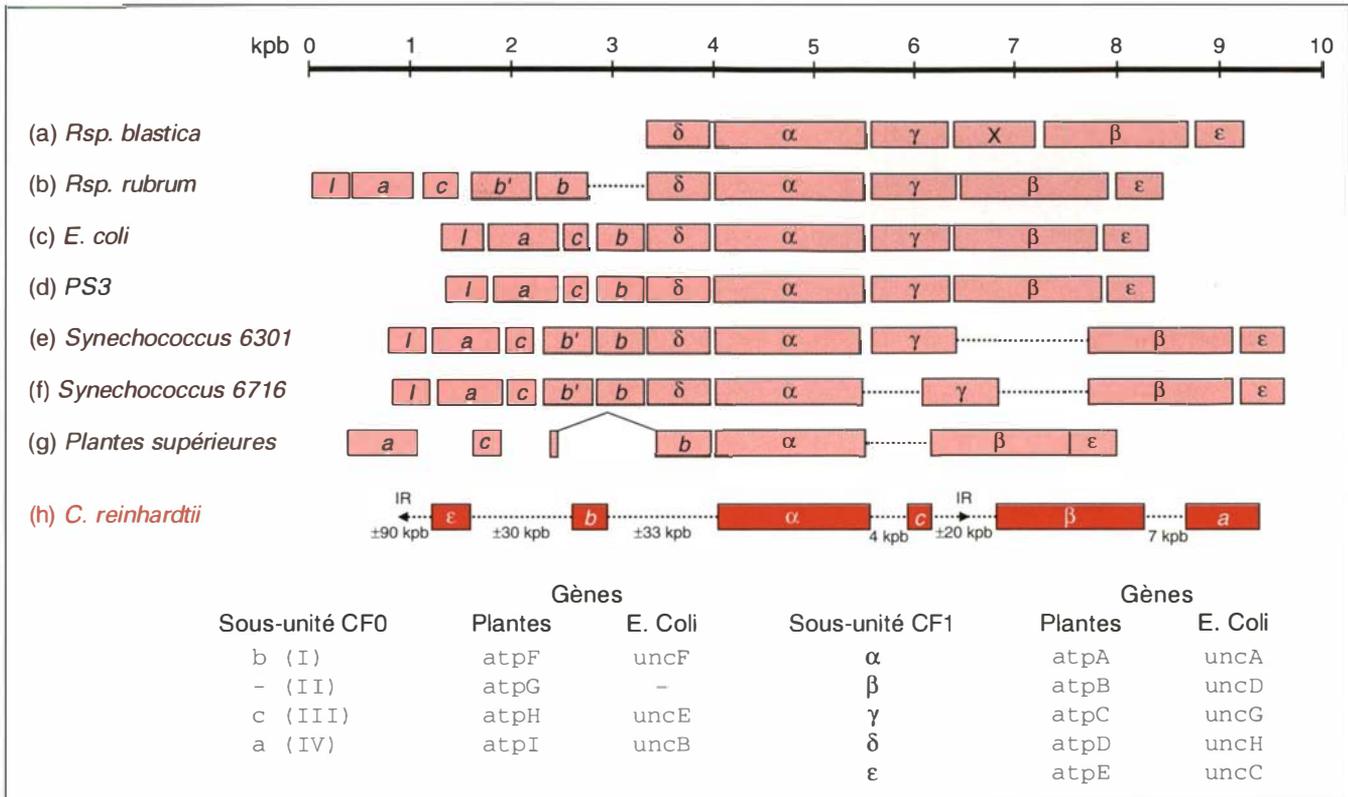


Figure 3. **Organisation comparative des gènes de l'ATP synthétase chez des procaryotes et dans le chloroplaste d'eucaryotes photosynthétiques.** *Rps* (*Rhodospinillum*), *E* (*Escherichia*), bactérie *PS3*. Les sous-unités non représentées dans le cas des chloroplastes de plantes supérieures ou de *C. reinhardtii* sont localisées dans le génome nucléaire (d'après [41]).

gouvernent les autres gènes chloroplastiques.

La transcription

Une ou deux ARN polymérases ?

L'existence d'une ARN polymérase de type bactérien, codée par le génome chloroplastique, est révélée par la présence des gènes *rpo* codant pour des protéines analogues aux sous-unités α , β , β' , β'' de l'ARN polymérase de *E. Coli*. Son site d'action sur l'ADNcp est identifié par la comparaison systématique des régions situées en amont des gènes chloroplastiques. Dans la plupart des cas, on trouve une séquence consensus, le palindrome octanucléotidique TA-

TAATAT, située dans la région - 10 vis-à-vis du site d'initiation de la transcription, qui est analogue à la séquence promotrice, TATAAT que l'on rencontre chez les procaryotes. Cependant la séquence correspondante dans la région - 35, TTGACA, est fréquemment absente, comme c'est d'ailleurs le cas chez les bactériophages ou les cyanobactéries. Chez *C. reinhardtii*, où les analyses moléculaires des promoteurs sont encore rares [22], l'étude du promoteur de *atpB* a été entreprise en utilisant les méthodes récentes de transformation génétique du chloroplaste. Ce travail, utilisant des fusions de différentes parties de la région 5' amont du gène *atpB* avec le gène rap-

porteur *uidA* de *E. Coli*, puis des délétions en amont et en aval du site d'initiation de la transcription, a mis en évidence une contribution de régions 5' non traduites de *atpB* à l'activité promotrice [23]. La contribution de régions en amont et de régions internes d'un gène chloroplastique à l'initiation de sa transcription a été mise en évidence dans plusieurs cas chez les plantes supérieures où les études de transcription *in vitro* sont nombreuses [24]. Elles autorisent à penser que chez *C. reinhardtii* également, elles reflètent la contribution de facteurs additionnels d'origine nucléaire, parmi lesquels on trouve des facteurs de type sigma.

La détection de deux activités ARN

polymérase distinctes dans les chloroplastes extraits de plantes supérieures et, dans un cas au moins, la présence d'une boîte TATA [25], permettent de penser qu'une ARN polymérase d'origine nucléaire pourrait contribuer également à la transcription [24]. Elle serait responsable de l'expression des gènes résiduels du génome plastidial de la plante parasite *Epifagus virginiana* [26]. Celui-ci est dépourvu des gènes de la photosynthèse et des gènes *rpo*, codant l'ARN polymérase plastidiale, mais comporte encore les gènes *rps* et *rpl* et *trn*, responsables de la traduction. Une hypothèse séduisante serait que, dans le chloroplaste, les gènes assurant la traduction seraient transcrits par une ARN polymérase codée par le noyau, ce qui permettrait ensuite l'expression des autres gènes codant les protéines de l'appareil photosynthétique.

Une transcription mono ou polycistronique ?

L'absence de regroupements génétiques mono-fonctionnels évoquée plus haut, conduit à privilégier l'hypothèse d'une transcription indépendante de la plupart des gènes chloroplastiques comme c'est le cas pour les gènes nucléaires. De fait, la grande majorité des transcrits du chloroplaste accessibles à l'analyse sont monocistroniques. Pourtant, les travaux les plus récents aboutissent à relativiser cette affirmation. On découvre, aussi bien chez les plantes supérieures que chez *C. reinhardtii*, les indices d'une cotranscription de gènes parfois sans relation fonctionnelle [27]. Chez *C. reinhardtii*, on trouve par exemple un transcript polycistronique regroupant un gène codant une sous-unité du photosystème II (PSII), *psbD*, et un exon du gène codant une sous-unité du photosystème I (PSI), *psaAII*, qui sera ultérieurement épissé en trans pour constituer le transcript traductible du gène *psaA* [28]. Plus récemment un cotranscrit *pelA-pelD* a été mis en évidence chez des mutants présentant des délétions dans la région intergénique impliquée dans la maturation des transcrits [29]. Ces gènes sont pourtant

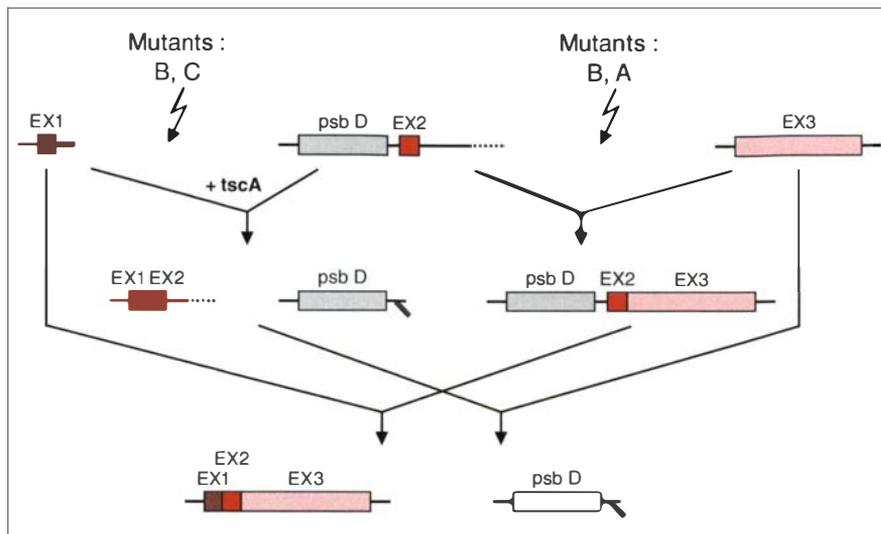


Figure 4. Épissage en trans du gène *psaA* chez *C. reinhardtii*. Les trois exons du gène *psaA* sont transcrits sous forme de trois précurseurs indépendants qui sont ensuite assemblés en trans pour former l'ARN messager mature. Deux réactions d'épissage, entre l'exon 1 et l'exon 2 d'une part, entre l'exon 2 et l'exon 3 d'autre part, peuvent se produire indépendamment et dans un ordre indifférent. La première de ces réactions d'épissage requiert un cofacteur, le transcript du gène *tscA*, et libère le transcript de *psbD*. Les mutants nucléaires de classe C sont incapables de réaliser cette réaction, tandis que les mutants nucléaires de classe A sont déficients dans l'épissage des exons 2 et 3. Enfin, les mutants nucléaires de classe B ne produisent ni l'un, ni l'autre, de ces réactions d'épissage (d'après [28]).

distants d'environ 3kpb et sont dotés chacun d'un promoteur indépendant. Ils peuvent néanmoins être cotranscrits à partir du seul promoteur de *pelA* puis scindés en deux ARNm matures. Le cotranscrit intermédiaire est d'une durée de vie trop courte pour être observé dans la souche sauvage. On doit donc envisager d'éventuels processus de maturation rapides de transcrits polycistroniques en transcrits monocistroniques qui ne peuvent être mis en évidence qu'à l'aide de mutants altérés dans ces processus eux-mêmes. Cette hypothèse comporte deux implications: les signaux de terminaison de la transcription chloroplastique seraient faibles et il y aurait de nombreux sites de maturation de l'ARN, impliquant des coupures endonucléotidiques.

L'étape post-transcriptionnelle

Conversion de messagers dicistroniques en messagers monocistroniques

La dissection des sites de maturation des transcrits polycistroniques évoqués ci-dessus devra donc être entreprise. La possibilité de transformer le génome chloroplastique par recombinaison homologue se révèle ici très précieuse puisque des mutations spécifiques peuvent être introduites dans les régions cibles. Les extrémités 3' des transcrits chloroplastiques comportent fréquemment des séquences permettant un repliement en tige-boucle, impliquées dans leur stabilité, qui ont été longtemps interprétées comme de possibles signaux de terminaison de la transcription. En fait, elles pourraient également

participer aux processus de maturation, d'une part en contribuant à la formation du site de coupure endonucléotidique, mais surtout en offrant une résistance à l'activité d'exonucléases 3'-5' consécutive à cette coupure.

Épissages

Les transcrits primaires du chloroplaste peuvent subir d'autres processus de maturation avant d'être utilisés dans l'étape traductionnelle. Si l'édition (*editing*) d'ARN a été observée dans quelques cas chez les chloroplastes de plantes supérieures, il n'existe aucun indice d'une telle activité chez *C. reinhardtii*. En revanche, on trouve des exemples d'épissage en *cis* et en *trans*. Le gène *psbA* ou celui de l'ARNr 23S comporte des introns de groupe I, ce qui requiert une activité d'épissage en *cis*. Dans le deuxième cas l'intron considéré code une endonucléase de l'ADN double-brin, ce qui évoque les propriétés de certains introns de mitochondries de levure [8].

On sait que certains gènes sont « éclatés », soit transcrits dans des sens opposés, soit séparés par des séquences chromosomiques comportant de nombreux autres gènes. Les ARNm correspondants doivent alors être épissés en *trans*, par un mécanisme en général bimoléculaire. L'exemple désormais classique d'épissage en *trans* est fourni par le gène *psaA* de *C. reinhardtii* [28]. Il est fragmenté en trois exons, dispersés autour du chromosome (*figure 2*), et transcrits indépendamment. L'existence de nombreux mutants nucléaires altérés dans l'épissage de *psaA*, et regroupés en trois classes phénotypiques, a permis d'identifier les étapes intermédiaires de maturation des transcrits (*figure 4*). Des études de complémentation et de recombinaison génétique entre ces mutants conduisent à définir au moins 14 gènes, et donc de nombreux facteurs nucléaires, gouvernant ce processus. Fait plus remarquable encore, un locus chloroplastique a également été identifié, définissant le gène *tscA* qui ne code pas une protéine : *tscA* fournit un petit ARN qui vient s'adjoindre aux

deux transcrits primaires portant les exons *psaAI* et *psaAII* pour constituer un intron de type II, requis pour l'épissage de ces deux exons [8].

Des messagers d'une grande stabilité

Les transcrits chloroplastiques se distinguent de leurs homologues bactériens par une durée de vie particulièrement longue ($t_{1/2}$ de plusieurs heures, contre quelques minutes). Divers motifs en *cis*, à l'extrémité 5' ou 3' des transcrits contribuent à leur stabilité. Ainsi le transcrit du gène rapporteur *uidA* de *E. Coli*, associé en 5' à la région non-traduite de *rbcL*, est moins stable dans le chloroplaste de *C. reinhardtii* que lorsqu'on lui associe la région correspondante de *atpB* [30]. L'extrémité 3' des transcrits semble jouer un rôle stabilisateur particulièrement significatif. Il proviendrait de ces inversions répétées que nous venons d'évoquer, qui sont propices à la formation d'une structure en tige-boucle. Ainsi, des constructions formées du gène *atpB* de *C. reinhardtii* tronqué en 3' sur des longueurs variables, une fois replacées par transformation génétique du chloroplaste en lieu et place du gène *atpB* résidant, produisent des transcrits stables tant que cette tige-boucle n'est pas altérée [31]. Pourtant certains ARNm bactériens, dont la durée de vie est plus brève, présentent également ces structures potentielles en tige-boucle [32]. La longévité particulière des transcrits du chloroplaste doit donc sans doute être attribuée à des facteurs nucléaires agissant en *trans*. En effet une variété de mutants nucléaires de *C. reinhardtii* sont sélectivement altérés dans la stabilité d'un transcrit du chloroplaste, qu'il provienne d'un gène codant une sous-unité du photosystème II, de l'ATP synthétase ou du complexe *cytb6f* [8]. La cible de ces facteurs nucléaires est bien souvent l'extrémité 3' des transcrits [33, 34] mais une étude récente montre qu'elle peut également être située à leur extrémité 5' [35].

La traduction

Comme il a déjà été dit, le génome

chloroplastique de *C. reinhardtii* ne code qu'une partie des gènes nécessaires à la traduction. Environ un tiers des sous-unités ribosomiques spécifiques du chloroplaste sont codées dans l'organite, tout comme l'est le facteur d'élongation (EF-Tu) ou le facteur d'initiation (IF-1) présent dans le génome chloroplastique des plantes supérieures [27].

A une exception près, tous les gènes codant les protéines du chloroplaste de *C. reinhardtii* comportent un codon initiateur AUG. Pourtant des expériences récentes réalisées par transformation du gène *pepD* ont montré que les codons substitutifs utilisables chez *E. coli*, AUU et AUC conservent, bien qu'affaibli, un pouvoir d'initiation dans l'organite [36]. D'autres éléments de la région 5' non traduite des transcrits du chloroplaste les rendent également traduisibles. Ainsi, une structure en tige-boucle située en amont du codon d'initiation du transcrit de *psbC*, codant la protéine P6 du PSII, doit présenter un défaut d'appariement dans la tige pour que le transcrit soit traduisible. Une simple substitution qui réalise la conversion en un appariement parfait interdit la traduction [8]. Là encore, l'isolement de mutants nucléaires supprimeurs de cette mutation chloroplastique indique que des facteurs nucléaires interviennent pour déstabiliser cette structure secondaire et permettre la traduction de l'ARNm.

L'intervention de facteurs nucléaires, gouvernant spécifiquement la traduction d'un seul gène du chloroplaste, semble être la règle. Un grand nombre de mutants nucléaires présentent en effet un défaut dans la synthèse d'un seul polypeptide codé par le chloroplaste, alors même que le transcrit du gène correspondant est présent. L'étude de ces mutants permettra de déterminer si ces facteurs nucléaires interviennent dans l'initiation de la traduction, son élongation ou encore dans la stabilisation des chaînes polypeptidiques naissantes.

On peut séparer deux classes de polysomes chloroplastiques, les polysomes libres dans le stroma du chlo-

roplaste et les polysomes liés aux membranes internes du chloroplaste, les thylacoïdes. Le consensus, plus que l'expérience, veut que les premiers soient impliqués dans la traduction des protéines chloroplastiques solubles tandis que les seconds seraient consacrés à l'insertion co-traductionnelle des protéines thylacoïdales transmembranaires. Les hypothèses que l'on peut formuler quant à la régulation de la biogenèse des protéines du thylacoïde dépendent largement de leur mode d'insertion, co- ou post-traductionnel, dans la membrane. La connaissance des sites de traduction des différentes chaînes polypeptidiques dans le chloroplaste constitue donc un sujet d'étude fondamental largement non défriché à ce jour.

Les facteurs nucléaires spécifiques agissant sur la stabilisation des transcrits et la traduction obéissent à des fonctions physiologiques distinctes

Nous avons vu que l'expression de la plupart des gènes chloroplastiques codant l'une des protéines impliquées dans la photosynthèse, est gouvernée par plusieurs facteurs nucléaires spécifiques. Les études de génétique classique réalisées chez *C. reinhardtii* ont abondamment montré que plusieurs gènes nucléaires sont impliqués dans l'expression d'un seul gène chloroplastique (*Tableau I*). Si l'on excepte le cas particulier du gène *psaA*, dont l'épissage en *trans*, déjà évoqué, mobilise au moins quatorze facteurs nucléaires, l'expression des autres gènes requiert probablement au moins deux facteurs nucléaires, l'un intervenant dans la stabilisation du transcrit, l'autre dans sa traduction. Si l'on étend cette propriété à l'ensemble des 120 gènes codant des protéines que contient le chromosome chloroplastique, il convient alors d'imaginer qu'au moins 250 gènes nucléaires sont mobilisés pour l'expression des gènes du chloroplaste. On conçoit immédiatement que cette contrainte exercée sur l'expression génétique chloroplastique est de nature à pré-

server le rôle central du noyau dans l'expression génétique cellulaire par-delà sa contribution en gènes de structure codant des protéines localisées *in fine* dans l'organite.

Nous pouvons aujourd'hui esquisser quelques hypothèses sur la signification fonctionnelle de cette contrainte. Alors que les appareils de transcription et de traduction des organites sont homologues des appareils bactériens correspondants, leur mise en œuvre chez *C. reinhardtii* obéit à des régulations différentes. Nous soulignerons ici quatre propriétés particulières de l'expression génétique des organites. En premier lieu, nous traitons d'un état polyploïde. Les chloroplastes contiennent plusieurs dizaines de copies de leur chromosome. Le flux de transcrits, si chaque copie de l'ADNcp est compétente pour l'expression génétique, est donc potentiellement considérable. La deuxième caractéristique que nous avons évoquée plus haut, réside dans l'absence d'organisation en opéron supprimant du même coup la possibilité d'une coordination étroite de l'expression de sous-ensembles fonctionnels au niveau transcriptionnel. Alors que des facteurs nucléaires ont été identifiés génétiquement à chaque étape post-transcriptionnelle, il faut noter qu'aucun mutant nucléaire de *C. reinhardtii*, bloqué dans l'expression d'une sous-unité chloroplastique, ne s'est révélé altéré au niveau transcriptionnel. Nous en concluons que l'expression génétique dans les organites se distingue de celle des procaryotes par le transfert des étapes majeures de régulation du niveau transcriptionnel au niveau post-transcriptionnel.

Nous avons vu qu'une troisième caractéristique se révèle dans la grande stabilité des transcrits de l'organite. L'intervention du noyau à cette étape est manifestement essentielle puisque des facteurs nucléaires de stabilisation spécifiques de chaque transcrit ont été identifiés dans de nombreux cas. La quatrième propriété originale apparaît dans la relation entre taux de transcrits et activité traductionnelle. Nous l'illustrerons par notre étu-

de du gène *atpA* codant la sous-unité α de l'ATP synthétase [34]. L'expression de α est gouvernée spécifiquement au niveau traductionnel par un facteur nucléaire, comme en témoigne le phénotype d'un mutant nucléaire, le mutant *F54*. Ce mutant présente une accumulation trois fois excédentaire de l'ARNm de *atpA*. On peut donc penser que, dans ce cas, l'accumulation des transcrits provient de leur absence de traduction. Cela suggère qu'un processus de dégradation des transcrits est associé à la traduction. La situation est donc inverse de celle des mutants de traduction bactériens chez lesquels on observe une déstabilisation des transcrits non traduits. D'autres mutants de traduction chez *C. reinhardtii*, comme le mutant de *psbC* évoqué plus haut, illustrent cette stabilité des transcrits non traduits dans le chloroplaste.

Chez un autre mutant nucléaire, le mutant *nccl*, nous avons observé une déstabilisation significative des transcrits de *atpA* sans grandes conséquences sur le taux de synthèse de la sous-unité α , ou sur la concentration intracellulaire d'ATP synthétase active [34]. De ce phénotype inhabituel, nous concluons que la majorité des transcrits de *atpA* dans la souche sauvage n'est pas engagée dans la traduction. Cette observation est corroborée par d'autres expériences réalisées en présence de 5-fluorodésoxyuridine, un analogue de la thymidine qui, en bloquant la thymidilate synthétase, entraîne la décroissance du nombre de copies de l'ADNcp. Aucune altération significative de la synthèse de LS (la grande sous-unité de la RuBP carboxylase) ou de la sous-unité α de l'ATP synthétase n'a alors été observée bien que la quantité de transcrits soit affectée en proportion de la diminution du nombre des copies de l'ADNcp [37].

De ces quatre propriétés de l'expression génétique que nous venons d'évoquer, nous concluons que le flux de production des sous-unités polypeptidiques codées par le génome chloroplastique est étroitement gouverné par le noyau au niveau traductionnel. Cela requiert la présence

d'une concentration non limitante de transcrits pour engager la traduction à la hauteur des facteurs de régulation délivrés par le noyau. Cette économie de l'expression génétique chloroplastique impose alors la délivrance d'un deuxième type de facteurs nucléaires assurant une longévité suffisante des transcrits dont la plupart ne sont pas engagés dans la traduction.

Concertation dans l'expression génétique : l'exemple de la biogenèse des protéines photosynthétiques dans le chloroplaste

Les protéines de l'appareil photosynthétique sont associées au réseau de membranes internes du chloroplaste, les thylacoïdes. Elles présentent une grande complexité structurale puisqu'elles réunissent un grand nombre de sous-unités polypeptidiques, certaines étant transmembranaires, d'autres périphériques, situées sur l'une ou l'autre face des thylacoïdes. Ces protéines oligomériques comportent également divers cofacteurs, ions métalliques, pigments, hèmes, centres fer-soufre, qui leur confèrent leur spécificité fonctionnelle. L'intégration de ces différentes fonctions au niveau du thylacoïde, capture de l'énergie lumineuse, propriétés d'oxydo-réduction, synthèse d'ATP, permet l'activité photosynthétique [3].

Dans les organites, la complexité de la biogenèse de chaque édifice protéique est encore accrue par la dualité de l'origine génétique des sous-unités qui les composent. Le *Tableau 1* montre que les quatre complexes protéiques principaux de l'appareil photosynthétique sont ainsi constitués de sous-unités codées, pour certaines par le génome nucléaire, pour d'autres par le génome chloroplastique. La biogenèse de tels complexes oligomériques conduit à s'interroger sur les mécanismes de régulation qui permettent de maintenir la concentration des différentes sous-unités dans la stœchiométrie requise pour leur assemblage en un complexe protéique fonctionnel.

Notre propos sera centré sur la production des polypeptides codés dans le chloroplaste mais nous évoquerons brièvement le cas des sous-unités qui sont importées du cytoplasme.

Les sous-unités d'une même protéine oligomérique s'accumulent de façon concertée

L'isolement de mutants de photosynthèse de *C. reinhardtii* a permis d'établir une règle fondamentale de la biogenèse des protéines de l'appareil photosynthétique. Des mutants déficients en une activité d'un complexe protéique thylacoïdal, qu'ils soient d'hérédité nucléaire ou chloroplastique, présentent dans leur grande majorité, un même phénotype pléiotrope : plusieurs polypeptides sont absents de la membrane [8]. Ces palettes de déficiences polypeptidiques sont spécifiques de chaque déficience fonctionnelle : un sous-ensemble est sélectivement absent dans les mutants dépourvus d'activité PSII, un autre dans les mutants PSI, etc. Des études biochimiques complémentaires ont permis d'établir que ce sont bien les différentes sous-unités d'une même protéine oligomérique qui sont collectivement altérées dans chaque cas. Cette altération concerne aussi bien les sous-unités codées dans le chloroplaste que celles codées dans le noyau, avec quelques exceptions notables. Ainsi, les sous-unités extrinsèques du PSII, d'origine nucléaire, s'accumulent dans le *lumen* du thylacoïde en l'absence de la partie transmembranaire du complexe constituée de sous-unités codées dans le chloroplaste.

Il y a donc un (ou des) mécanisme(s) de régulation assurant l'accumulation concertée des sous-unités d'une même protéine oligomérique. Des caractéristiques de l'expression génétique dans le chloroplaste que nous avons esquissées, il apparaît que les taux de synthèse des différentes sous-unités protéiques d'une même protéine oligomérique de l'appareil photosynthétique ne sont pas étroitement gouvernés au niveau prétraductionnel.

La contribution essentielle d'une dégradation post-traductionnelle des sous-unités non assemblées

Les mutants inactivés dans le gène de structure chloroplastique d'une sous-unité protéique, en raison d'une délétion, d'une insertion ou d'une substitution non sens, représentent une classe de mutants bien adaptée à l'étude de la production concertée des sous-unités d'un même complexe. On peut alors analyser *in vivo*, par marquage court des cellules en présence d'acétate-¹⁴C ou de sulfate-³⁵S, les taux de synthèse des autres sous-unités du complexe protéique. Dans la plupart des cas, des expériences de chasse du marquage incorporé ont permis d'établir que ces sous-unités ont une durée de vie plus courte mais que leur taux de synthèse n'est pas altéré. Par exemple, une souche portant une délétion du gène *petB* codant l'apocytochrome b6, présente un taux de synthèse de la sous-unité IV, appartenant au même complexe protéique, analogue à celui de la souche sauvage. Mais la durée de vie de cette sous-unité n'est plus que de 15 minutes environ quand elle est de plusieurs heures dans la souche témoin [38]. La même observation prévaut lorsque la conversion d'une apoprotéine en protéine mature est interdite, par exemple en détruisant, par mutagenèse dirigée, les sites de liaison d'un cofacteur. Une souche construite pour produire un apocytochrome f dépourvu des cystéines ligands de l'hème c, donc incapable d'une synthèse du cytochrome f, induit une dégradation rapide non seulement de l'apocytochrome f mais aussi des autres sous-unités du complexe cytb6f (Kuras et Wollman, manuscrit en préparation). Ces deux exemples illustrent ce fait qu'un défaut d'assemblage, provoqué par l'absence d'une sous-unité ou par une conformation impropre de l'une d'elle, conduit à la protéolyse rapide des sous-unités résiduelles. Ce type de mécanisme post-traductionnel suffit à expliquer la disparition des sous-unités d'origine nucléaire dans les mutants étudiés. Ces sous-unités sont

normalement synthétisées et transloquées vers leur site d'assemblage mais sont rapidement dégradées si leurs partenaires chloroplastiques font défaut. Les mécanismes de dégradation protéolytique dans le chloroplaste n'ont pas encore été étudiés. Ils pourraient impliquer une protéase de type Clp, dont la fonction, chez les procaryotes, serait semblable à celle des protéases dépendantes de l'ubiquitine chez les eucaryotes. On trouve, en effet, sur le génome chloroplastique, un homologue du gène bactérien *clpP* (figure 2) qui participe, au côté de *clpA* qui serait ici nucléaire, à la formation d'un complexe dimérique doté d'activité protéolytique. L'inactivation de ce gène chloroplastique chez *C. reinhardtii* est létale [39].

Une régulation inattendue des taux de synthèse

Chez divers mutants de photosynthèse de *C. reinhardtii*, les études *in vivo* des taux de synthèse protéique dans le chloroplaste ont conduit à une observation inattendue. Dans plusieurs cas, l'absence de synthèse d'une sous-unité particulière, que ce soit dans le PSII, le PSI, le *cytb6f* ou l'ATP synthétase, conduit à la diminution du taux de synthèse d'une autre sous-unité. Ces observations nous ont conduit à évoquer un « effet épistatique » dans les synthèses protéiques du chloroplaste par un emprunt aux concepts issus de la génétique (Tableau II). La nature de l'interaction entre la sous-unité que nous appelons « dominante » (celle dont l'expression est abolie dans un mutant), et l'une de ses partenaires que nous nommerons « cible » (celle dont la synthèse est consécutivement altérée), n'est pas élucidée à ce jour. Les expériences récentes que nous avons réalisées sur le complexe *cytb6f* ont affiné notre regard sur cette régulation [38]. Une souche portant une délétion du gène codant la sous-unité IV (*petD*) présente une diminution de 90 % du taux de synthèse du cytochrome *f* (codé par le gène *petA*), sans diminution de la durée de vie du polypeptide synthétisé. Une régu-

Tableau II			
EFFET « ÉPISTATIQUE » DANS LES SYNTHÈSES PROTÉIQUES CHLOROPLASTIQUES			
Complexe protéique	Sous-unité		cible
	dominante		
Cytochrome <i>b6f</i>	IV	>	<i>cyt.f</i>
ATP synthétase	β	>	α
Photosystème II	D2	>	D1
	D1	>	P5
Photosystème I	P2a	>	P2b

Effet « épistatique » dans les synthèses protéiques chloroplastiques. Chaque sous-unité « dominante » gouverne le taux de synthèse de la sous-unité « cible » correspondante.

lation précoce de la synthèse du cytochrome *f* par la sous-unité IV est donc à l'œuvre. Deux classes d'hypothèses nous paraissent devoir être considérées : (1) l'insertion dans la membrane du cytochrome *f* est co-traductionnelle ; l'association à la membrane du thylacoïde des polyosomes chargés du transcrit *petA* est modulée par la présence de la sous-unité IV ; (2) l'insertion est post-traductionnelle et c'est le taux d'insertion du cytochrome *f* dans la membrane qui est gouverné par la sous-unité IV, l'excédent de cytochrome *f* étant rapidement protéolysé dans le stroma. On retrouve ici la question clef posée précédemment quant à l'insertion co-traductionnelle ou post-traductionnelle des protéines transmembranaires du thylacoïde. Les études de l'expression génétique du chloroplaste de *C. reinhardtii* ont donc permis d'établir que la biogenèse des protéines oligomériques de l'appareil photosynthétique n'est pas étroitement réglée au niveau pré-traductionnel. Elle est gouvernée par l'intervention de deux mécanismes. L'un, post-traductionnel « tardif », met en jeu la dégradation de la plupart des sous-unités intégrées dans la membrane mais non assemblées. L'autre, co-traductionnel ou post-traductionnel « précoce », asservit étroitement la synthèse de certaines sous-unités cibles à la présence de leurs partenaires d'assemblage. Là encore, une contribution éventuelle de fac-

teurs nucléaires de régulation devra être recherchée.

Remerciements

Nous remercions Yves Choquet et nos collègues du groupe « Intégration et biogenèse des protéines du thylacoïde » de l'URA 1187 du Cnrs, pour leur lecture critique de cette présentation.

Références

- Mounolou J, Jakob H, Slonimski P. Mitochondrial DNA from yeast « petite » mutants : Specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 1966 ; 24 : 218.
- Mounolou J. Mutations of mitochondrial DNA. In : Slater EC, et al., eds. *Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria*. Bari : Adriatica editrice, 1968 : 473
- Harris E. *The Chlamydomonas Sourcebook. A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego, California : Academic Press, Inc. 1989.
- Bennoun P, Deleplaire P. Isolation of photosynthesis mutants in *Chlamydomonas*. In : *Methods in chloroplast molecular biology*. Amsterdam : Elsevier Biomedical Press, 1982 : 25-38.
- Dorthu MP, Remy S, Michel-Wolwertz MR, Colleaux L, Breyer D, Beckers MC, Englebert S, Duyckaerts C, Sluse F, Matagne R. Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 1992 ; 18 : 759-72.



6. Matagne R, Remacle C, Dinant M. Cyto-duction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 7447-50.
7. Boynton J, Gillham N, Harris E, Hosler J, Johnson A, Jones A, Randolph-Anderson B, Robertson D, Klein T, Shark K, Sanford J. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 1988 ; 240 : 1534-41.
8. Rochaix JD. Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu Rev Cell Biol* 1992 ; 8 : 1-28.
9. Randolph-Anderson B, Boynton J, Gillham N, Harris E, Johnson A, Dorthu MP, Matagne R. Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* 1993 ; 236 : 235-44.
10. Kindle K. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 1228-32.
11. Purton S, Rochaix JD. Complementation of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant using a genomic cosmid library. *Plant Mol Biol* 1994 ; 24 : 533-7.
12. Zhang H, Herman P, Weeks D. Gene isolation through genomic complementation using an indexed library of *C. reinhardtii* DNA. *Plant Mol Biol* 1994 ; 24 : 663-72.
13. Tam LA, Lefebvre P. Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* 1993 ; 135 : 375-84.
14. Sodeinde O, Kindle K. Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 9199-203.
15. Vahrenholz C, Riemen G, Pratie E, Dujon B, Michaelis G. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8 kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet* 1993 ; 24 : 241-7.
16. Debuchy R, Purton S, Rochaix JD. The argininosuccinate lyase gene of *C. reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J* 1989 ; 8 : 2803-9.
17. Ferris P, Goodenough U. The mating type locus of *C. reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* 1994 ; 76 : 1135-45.
18. Girard-Bascou J. Mutations in four chloroplast loci of *Chlamydomonas reinhardtii* affecting the photosystem I reaction centers. *Curr Genet* 1987 ; 12 : 483-8.
19. Harris E, Burkhart B, Gillham N, Boynton J. Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16s and 23s rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics* 1989 ; 123 : 281-92.
20. Newman S, Harris E, Johnson A, Boynton J, Gillham N. Nonrandom distribution of chloroplast recombination events in *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for a hotspot and an adjacent cold region. *Genetics* 1992 ; 132 : 413-29.
21. Popot JL, de Vitry C. On the microassembly of integral membrane proteins. *Arch Rev Biophys Chem* 1990 ; 19 : 369-403.
22. Sakamoto W, Kindle K, Stern D. *In vivo* analysis of *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene expression using stable transformation of β -glucuronidase translational fusions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 497-501.
23. Klein U, De Camp J, Bogorad L. Two types of chloroplast gene promoters in *C. reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 3453-7.
24. Igloi GL, Kössel H. The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit Rev Plant Sci* 1992 ; 10 : 525-58.
25. Link G. DNA sequence requirements for accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid *in vitro* system from mustard. *EMBO J* 1984 ; 3 : 1687-95.
26. Morden CW, Wolfe KH, de Pamphilis CW, Palmer JD. Plastid translation and transcription genes in a nonphotosynthetic plant. *EMBO J* 1991 ; 10 : 3281-9.
27. Gruissem W, Tonkyn JC. Control mechanisms of plastid gene expression. *Crit Rev Plant Sci* 1993 ; 12 : 19-55.
28. Choquet Y, Goldschmidt-Clermont M, Girard-Bascou J, Kück U, Bennoun P, Rochaix JD. Mutant phenotypes support a trans-splicing mechanism for the expression of the tripartite *psaA* gene in *C. reinhardtii*. *Cell* 1988 ; 52 : 903-13.
29. Sturm N, Kuras R, Büschlen S, Sakamoto W, Kindle K, Stern D, Wollman FA. The *petD* gene is transcribed by functionally redundant promoters in *C. reinhardtii* chloroplasts. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 6171-9.
30. Salvador ML, Klein U, Bogorad L. 5' sequences are important positive and negative determinants of the longevity of *Chlamydomonas* chloroplast gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 1556-60.
31. Stern D, Radwanski E, Kindle K. A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation *in vivo*. *Plant Cell* 1991 ; 3 : 285-97.
32. Brawerman G. Determinants of messenger RNA stability. *Cell* 1987 ; 48 : 5-6.
33. Hsu-Ching C, Stern D. Specific binding of chloroplast proteins *in vitro* to the 3' untranslated region of spinach chloroplast *petD* mRNA. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 4380-8.
34. Drapier D, Girard-Bascou J, Wollman FA. Evidence for nuclear control of the expression of the *atpA* and *atpB* chloroplast genes in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 1992 ; 4 : 283-95.
35. Nickelsen J, van Dillewijn J, Rahire M, Rochaix JD. Determinants for stability of the chloroplast *psbD* RNA are located within a short leader region in *C. reinhardtii*. *EMBO J* 1994 ; 13 : 3182-91.
36. Chen X, Stern D, Kindle K. Initiation codon mutations in the *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene result in temperature-sensitive photosynthetic growth. *EMBO J* 1993 ; 12 : 3627-35.
37. Hosler JP, Wurtz EA, Harris EH, Gillham NW, Boynton JE. Relationship between gene dosage and gene expression in the chloroplast of *C. reinhardtii*. *Plant Physiol* 1989 ; 91 : 648-52.
38. Kuras R, Wollman FA. The assembly of cytochrome b6f complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 1994 ; 13 : 1019-27.
39. Huang C, Wang S, Chen L, Lemieux C, Otis C, Turmel M, Liu XQ. The *Chlamydomonas* chloroplast *clpP* gene contains translated large insertion sequences and is essential for cell growth. *Mol Gen Genet* 1994 ; 244 : 151-9.
40. Boudreau E, Otis C, Turmel M. Conserved gene clusters in the highly rearranged chloroplast genomes of *Chlamydomonas moewusii* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 1994 ; 24 : 585-602.
41. Falk G, Walker JE. DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the Fo membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem J* 1988 ; 254 : 109-122.

Francis-André Wollman
Jacqueline Girard-Bascou

Service de Photosynthèse (URA CNRS 1187), IBPC, 13, rue Pierre-et-Marie-Curie, 75005 Paris.

TIRÉS A PART

F.A. Wollman.



INFORMATIONS SFG

Réunions de la Société Française de Génétique

La SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE GÉNÉTIQUE (SFG) ET LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE GÉNÉTIQUE HUMAINE (SFGH) organiseront un colloque commun à l'Institut Pasteur - Paris les 2 et 3 février 1995 sur le thème « Mutations et Instabilité des génomes ».

Programme préliminaire :

2 février : Session 1 : contrôle de la stabilité des génomes

Modérateur: Miroslav Radman
Intervenants: J.P. Claverys, M. Debatisse Buttin, R. Fuchs, R. Kolodner, M. Radman, D. Touati, I. Varley

Session 2 : Mutations et réarrangements en pathologie humaine
Modérateur: Roland Berger
Intervenants: A. Aurias, M. Dorée, P. Gaudray, J.L. Mandel, E. Moustacchi, A. Sarasin, T. Soussi, G. Thomas, S. Wain-Hobson

3 février : Session 3 : Séquençage de l'ADN et technologies de détection des mutations et des polymorphismes

Modérateur: Bernard Dujon
Intervenants: B. Dujon, G. Vayssex, J. Weissenbach
Modérateur: Michel Goossens
Intervenants: M. Goossens, M. Tosl, M. Vidaud, R. Wagner

Conférence de clôture : Problèmes éthiques en génétique Humaine : H. Van den Berghe

Autres réunions

• DEUXIÈME RENCONTRE DU DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET STRUCTURALE DE GRENOBLE: « TRANSPORTS ACTIFS D'IONS ET D'AGENTS PHARMACOLOGIQUES DANS LES CELLULES EUKARYOTES ».

Villard-de-Lans, 26-28 janvier 1995. Comité d'Organisation: Y. Dupont, J.L. Girardot, G. Marguerie

Conférenciers invités: J.P. Andersen (Aarhus), E. Carafol (Zürich), J. Chelly

(Cambridge-Paris), Y. Dupont (Grenoble), T.C. Gilliam (New York), A. Goffeau (Louvain), P.L. Jorgensen (Copenhagen), S.J.D. Karlsh (Rehovot), P.L. Pedersen (Baltimore), J.R. Riordan (Toronto), G. Sachs (Los Angeles), G.A. Scarborough (Chapel Hill), A. Shapiro (Toronto), D. Stokes (Charlottesville), F.F. Wuytack (Leuven).

Renseignements: DBMS, CEN-G, 17, rue des Martyrs 38054 Grenoble.
Tél. (33) 76.88.46.77 ou (33) 76.88.39.07

Fax: (33) 76.88.54.87 ou (33) 76.88.61.65.
Date limite d'inscription: 15 décembre 1994.

• 7^e CONGRES EUROPÉEN DE BIOTECHNOLOGIE UN SIÈCLE APRÈS LOUIS PASTEUR.

Palais des Congrès de Nice-Acropolis, 1, esplanade Kennedy, Nice, 19-23 février 1995.

Informations - Inscriptions: ECB7 c/° Société de Chimie Industrielle 18, rue Saint-Dominique 75007 Paris.

Publication scientifique

Génétique et évolution de Michel Solignac*, Claudine Petit*, Georges Periquet*, Dominique Anxolabéhère*.

Cet ouvrage est consacré aux mécanismes de l'évolution biologique. Les modèles et concepts développés sont appropriés à l'enseignement universitaire de premier et deuxième cycles de génétique, de biochimie, de biologies cellulaire, animale, végétale, des populations, ainsi que de l'écologie. Ce livre s'adresse également aux élèves des grandes écoles.

L'ouvrage est scindé en deux tomes, complémentaires mais indépendants, ayant en commun le plan et la bibliographie générale : *I. la variation, les gènes dans les populations* traite des problèmes de génétique à l'intérieur de l'espèce, de la variation intraspécifique. *II. L'espèce, l'évolution moléculaire* décrit la spéciation et l'évolution des molécules de différentes espèces, l'évolution moléculaire supraspécifique.

* Michel Solignac, professeur à l'université Paris-Sud - Claudine Petit, professeur honoraire à l'université Paris VII - Georges Periquet, professeur à l'université François-Rabelais de Tours, Dominique Anxolabéhère, professeur de génétique à l'université Pierre-et-Marie Curie (Paris VI).

Hermann Éditeurs des Sciences et des Arts, 293, rue Lecourbe 75015 Paris.

Collection Méthodes, 1994, 195 x 255 ;
Tome I. : 300 p. ISBN 2 7056 6258 8 ;
Tome 2. : 350 p. ISBN 2 7056 6259 6.